

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 6 C12N 9/20</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 95/06720</p> <p>(43) 国際公開日 1995年3月9日 (09.03.95)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP94/01416 (22) 国際出願日 1994年8月26日(26. 08. 94)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平5/214506 1993年8月30日(30. 08. 93) JP</p> <p>(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 昭和電工株式会社(SHOWA DENKO K.K.)(JP/JP) 〒105 東京都港区芝大門1丁目13番9号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者:および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 石田礼子(ISHIDA, Reiko)(JP/JP) 〒210 神奈川県川崎市川崎区大川町5丁目1番 昭和電工株式会社 生産技術センター内 Kanagawa, (JP) 鈴木雅博(SUZUKI, Masahiro)(JP/JP) 小塚隆司(KOTSUKA, Takashi)(JP/JP) 崎元和範(SAKIMOTO, Kazunori)(JP/JP) 〒267 千葉県千葉市緑区大野台1丁目1番1号 昭和電工株式会社 総合研究所内 Chiba, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 大家邦久, 外(OHIE, Kunihisa et al.) 〒103 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口第2ビル7階 大家特許事務所 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AU, BR, CA, CN, FI, KR, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title : NOVEL LIPASE, MICROORGANISM PRODUCING THE LIPASE, PROCESS FOR PRODUCING THE LIPASE, AND USE OF THE LIPASE</p> <p>(54) 発明の名称 新規リパーゼ、そのリパーゼを生産する微生物、そのリパーゼの製造方法及び用途</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A microorganism belonging to the genus <i>Pseudomonas</i>, an alkaline lipase produced thereby and having the following properties, a process for producing the lipase, and a detergent composition containing the lipase: (1) base: triolein emulsion, working pH: 3.5 to 12 and optimum pH: 10 to 11; (2) base: triolein emulsion, working temperature: 30 to 80 °C, and optimum temperature: 55 to 65 °C; (3) molecular weight determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: 31,000±2,000; and (4) isoelectric point determined by isoelectric polyacrylamide gel electrophoresis: 5.2±0.5. This lipase is highly stable to the components of a detergent, such as surfactant and protease, can be used together with protease when incorporated in a detergent, is reduced in the damage to activity caused by the components of a detergent, and can increase the detergency of a detergent.</p>		

(57) 要約

シュードモナス (Pseudomonas) 属に属する細菌、その細菌が生産する以下の性質を有するアルカリリパーゼ、そのリパーゼの製造方法及びそのリパーゼを含有する洗剤組成物。

- (1) トリオレインエマルジョンを基質とし、作用 pH が 3.5~12、至適 pH が 10~11 ; (2) トリオレインエマルジョンを基質とし、作用温度が 30~80℃、至適温度が 55~65℃ ; (3) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定した分子量が 31000 ± 2000 ; (4) 等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定した等電点が 5.2 ± 0.5 。

本発明リパーゼは界面活性剤、プロテアーゼ等の洗剤成分に対する安定性が高く、プロテアーゼと共に洗剤に配合して用いることもでき、また洗剤成分による活性阻害が少なく、洗剤の洗浄力を増強できる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
BB	バルバドス	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
BE	ベルギー	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BF	ブルキナ・ファソ	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BG	ブルガリア	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BJ	ベナン	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BR	ブラジル	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャード
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CF	中央アフリカ共和国	IE	アイルランド	MR	モリタニア	TJ	タジキスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	VN	ヴェトナム
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド		

明 細 書

新規リパーゼ、そのリパーゼを生産する微生物、そのリパーゼの製造方法及び用途

5

技術分野

本発明は新規なリパーゼ、それを生産する微生物、そのリパーゼの製造方法及びその用途に関する。さらに詳しく言えば、シュードモナス (Pseudomonas) 属細菌の生産する、洗濯液中 (アルカリ性域) で活性を有するリパーゼ、それを生産する微生物、そのリパーゼの製造方法及び洗濯液中で脂質を分解することの出来る酵素を含有する洗剤組成物に関する。

15

背景技術

洗濯における洗浄効率の向上のために、洗剤に酵素を配合して利用することは従来より知られている。例えば、洗剤組成物にプロテアーゼを配合して被洗浄物に付着したタンパク質その他の污垢を分解除去すること、また、セルラーゼを配合してセルロース繊維被洗浄物に付着した污垢を除去すること、あるいはアミラーゼ等の多糖分解酵素を配合して被洗浄物に付着した多糖その他污垢を分解除去することが知られている。更に、近年においては、洗剤にリパーゼを配合して被洗浄物に付着した脂質を分解除去し洗浄効率を向上出来ることが知られている。

25

この用途は、アンドレー（H. Andree）らによる「洗剤成分としてのリパーゼ」（Lipase as detergent components）と題する報文（Journal of Applied Biochemistry, 2, 218-229 (1980)）等に記載されている。

- 5 好ましい洗剤配合用のリパーゼは、洗濯液中で十分にリパーゼ活性が機能するものである。通常の洗濯条件では洗剤液のpHがアルカリ性領域にあるため、アルカリ性pH域で機能するリパーゼが求められる。また、一般に脂質汚れは高温高アルカリ条件下では比較的除去され
- 10 やすいが、低温（60℃以下）の洗浄では十分に脂質汚れを除去出来ないことが知られている。従来より主として低温で洗濯が行われているわが国はもとより、欧米においても洗濯温度は低温化する傾向にあり、従って、好ましい洗剤配合用リパーゼは、低温でも十分に機能する
- 15 ものである。また、好ましい洗剤配合用リパーゼは、界面活性剤等の洗剤成分や、多くの洗剤に含有されているプロテアーゼや漂白剤存在下でも洗濯時に充分機能を発揮しうるものである。さらに、好ましい洗剤配合用リパーゼは、洗剤に配合した状態で保存する時にも共存する
- 20 洗剤含有成分に対して安定であるものである。以上のような好ましい特性を有するリパーゼを配合してなる脂質汚れに対して高い洗浄効果を有する洗剤組成物の開発が望まれている。

- 25 微生物の生産するリパーゼは、シュードモナス（Pseudomonas）属、アルカリゲネス（Alcaligenes）属、アク

ロモバクター (Achromobacter) 属、ムコール (Mucor) 属、キャンディダ (Candida) 属、フミコーラ (Humicola) 属等に由来することが知られている。

しかしながら、これらの菌株から得られる大部分のリパーゼはその至適 pH が中性から微アルカリ性にあるため、アルカリ性の洗剤溶液中で充分にリパーゼが機能せず、また、洗剤溶液中での安定性も低い。

さらには、アクロモバクター (Achromobacter) 属、キャンディダ (Candida) 属、ムコール (Mucor) 属、フミコーラ (Humicola) 属由来の各リパーゼは、アニオン性界面活性剤の共存下においてその活性を強く阻害される。

また、シュードモナス (Pseudomonas) 属に属する微生物がリパーゼを生産することは、広く知られている。

リパーゼを生産するシュードモナス (Pseudomonas) 属の菌株にはシュードモナス・フルオレッセンス (Ps. fluorescens)、シュードモナス・セパシア (Ps. cepacia)、シュードモナス・フラギ (Ps. fragi)、シュードモナス・アルカリゲネス (Ps. alcaligenes)、シュードモナス・シュードアルカリゲネス (Ps. pseudoalcaligenes)、シュードモナス・アエルギノサ (Ps. aeruginosa) がある。しかし、これらの菌株から得られる公知のリパーゼも前記の特性を満足するものではない。

発明の目的

従って、本発明の目的は洗濯液中で充分機能し、共存する洗剤含有成分により活性がほとんど阻害されることなく、かつ界面活性剤やプロテアーゼ等他の洗剤成分に
5 対する安定性が高いリパーゼ、かかるリパーゼを生産する微生物、そのリパーゼの製造方法を提供することにある。

また、本発明の他の目的は前記リパーゼを洗浄補助剤として含有する洗剤組成物、さらには前記リパーゼの他
10 にプロテアーゼなど他の酵素を含んでなる酵素含有洗剤組成物を提供することにある。

発明の開示

本発明者らは、前記の性質を有するリパーゼを得るべく、多数の微生物を分離し、培養して検索した結果、東京都下の土壌より分離した菌株であるシュードモナス s
15 p. (Pseudomonas sp.) S D 7 0 5 株に代表されるシュードモナス (Pseudomonas) 属に属する菌株が、洗剤配合用として有効な新規なリパーゼを生産することを見出し本発明を完成するに至った。
20

すなわち、本発明はシュードモナス (Pseudomonas) 属に属する微生物あるいはその変異株が生産する、p H 3.5 ~ 12 の作用 p H 測定範囲全域で作用し、至適温度が 55 ~ 65 °C 付近にある新規リパーゼに関するもので
25 ある。

また、本発明は、前記リパーゼの製造方法、そのリパーゼを産生する新規微生物、そのリパーゼを含有する洗剤組成物に関する。

5

図面の簡単な説明

図1は本発明のSD705株の生産するリパーゼの反応pHと相対活性との関係を示すグラフである。

図2は本発明のSD705株の生産するリパーゼの反応温度と相対活性との関係を示すグラフである。

10 図3は本発明のSD705株の生産するリパーゼを種々の温度にてpH7で1時間処理した場合の残存活性を示すグラフである。

図4は本発明のSD705株の生産するリパーゼを種々のpHにて37℃で1時間保持した後の残存活性を示すグラフである。

15

発明の詳細な説明

[生産菌]

本発明のリパーゼを製造するために使用する微生物は、
20 後記の性質を有するリパーゼを生産することができ、かつ後記の分類学上の性質を有するシュードモナス (Pseudomonas) 属細菌であれば特に限定されない。このような細菌は、保存菌株中から、または自然界から新たに分離した微生物中から選択することができる。またこれらの
25 細菌の自然または人工変異株であっても、後記の性質を

有するリパーゼの生産能を有する限り、当然包含されるものである。かかる細菌菌株は土壌その他の分離源から常法に従って分離することができる。目的とする菌株の選択は、被検微生物を例えば通常の細菌用培地中で培養し、高pH常温条件下での培養液のリパーゼ活性を常法に従って測定することにより行なうことができる。

本発明の新規なりパーゼを生産するシュードモナス (Pseudomonas) 属に属する菌株の一例として、本発明者らが東京都下の土より分離したSD705株が挙げられる。

このSD705株の菌学的性質は表1に示す通りである。なお、表1には、バージーズ・マニュアル・オブ・システマティック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984) を参考にして本菌と比較的類似の菌学的性質をもつシュードモナス・アルカリゲネス (Pseudomonas alcaligenes)、シュードモナス・シュードアルカリゲネス (Pseudomonas pseudoalcaligenes) の菌学的性質を併記した。

表 1

	SD705株	シュドモナス・ アルカリゲネス	シュドモナス・ シュドアルカリゲネス
5	(1) 形態	桿 菌	桿 菌
	(2) グラム染色性	陰 性	陰 性
	(3) 芽胞	な し	な し
	(4) 運動性	あ り	あ り
	(5) 鞭毛	極単毛	極単毛
	(6) オキシダーゼ	陽 性	陽 性
10	(7)カタラーゼ	陽 性	陽 性
	(8) 蛍光色素の産生	な し	な し
	(9) PHBの蓄積	陰 性	d
	(10) アルギニンジ ヒドロラーゼ	陰 性	d
	(11) 41℃での生育	可	可
15	(12) 脱窒反応	陰 性	陽 性
	(13) ゼラチン液化	陰 性	d
	(14) デンプン分解	陰 性	陰 性
	(15) グルコースの資化性	陰 性	陰 性
	(16) L-アスパラギン 酸塩の資化性	陰 性	陰 性
20	(17) L-グルタミン 酸塩の資化性	陽 性	陽 性
	(18) D-グルコン酸塩 の資化性	陰 性	d

表 1 (つづき)

		SD705株	シュドモナス・ アルカリゲネス	シュドモナス・ シュドアルカリゲネス
5	(19) L-ヒスチジンの資化性	陰 性	d	d
	(20) エタノールアミンの資化性	陰 性	陰 性	陽 性
	(21) n-ブタノールの資化性	陽 性	d	陽 性
	(22) イソブタノールの資化性	陰 性	d	陰 性
10	(23) グリセロールの資化性	陰 性	陰 性	d
	(24) ソルビトールの資化性	陰 性	陰 性	d
	(25) イタコン酸の資化性	陰 性	陰 性	d
	(26) メサコン酸の資化性	陰 性	陰 性	陽 性
15	(27) β -ヒドロキシ酪酸塩の資化性	陽 性	陰 性	陽 性
	(28) ベタインの資化性	陰 性	陰 性	陽 性
	(29) フラクトースの資化性	陰 性	陰 性	陽 性
	(30) グリセリン酸塩の資化性	陰 性	陰 性	陽 性
20	(31) GC含有 (%)	60	64~68	62~64

d : 該当する種に属する菌株の11~89%が陽性

SD705株は表1に示したように、エタノールアミン、メサコン酸、ベタイン、フラクトース、グリセリン酸塩の資化性がシュードモナス・シュードアルカリゲネスと異なり、アルギニンジヒドロラーゼの有無、脱窒反応の有無、 β -ヒドロキシ酪酸塩の資化性がシュードモナス・アルカリゲネスと異なっており、さらにGC含量は両菌株よりも低かった。

更に、定量的DNAのハイブリダイゼーションを日本細菌学雑誌, 45(5), 1990に基づいて、シュードモナス・アルカリゲネスの基準株ATCC909とシュードモナス・シュードアルカリゲネスの基準株ATCC17440とに対して行なったところ、両基準株に対して30%未満の相同性であった。これらの結果より本菌株はシュードモナス属に属するシュードモナス・アルカリゲネスの近縁種の新種であると決定した。

本菌株は通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology) に寄託され、FERM P-13781という受託番号が付与された。そして特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約 (BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE) に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4772という受託番号が付与された。

また、上記菌株を原菌株として自然または誘発突然変異により得た変異株を本発明によるリパーゼの生産菌として用いることができる。

前記変異株の調製法としては、例えば慣用の方法として、原菌株を紫外線照射処理あるいはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) 等の薬剤による人工的突然変異処理を施さずに、またはかかる処理を施して、オリーブオイル等の油を含む寒天培地に広げ、生育してくる菌株の中からコロニーのまわりに形成されるクリアゾーンの大きさが、より大きいコロニーを選抜し、リパーゼ生産用培地にて培養して生産性の最も優れた菌株を選抜する方法がある。

本発明のリパーゼ生産菌は、好ましくはSD705株とDNAハイブリダイゼーションにおいて50%以上のホモロジーを示す菌株、より好ましくは70%以上のホモロジーを示す菌株である。

[製造方法]

本発明のリパーゼはシュードモナス (Pseudomonas) 属に属する本リパーゼ生産菌を培養することにより、主として菌体外 (培養液中) に産生される。

培地の栄養源としては、通常培養に用いられているものが広く利用できる。炭素源としては同化できる炭素化合物またはこれを含有するものであればよく例えば油脂、コーンステープリカー、Tween系界面活性剤などが用いられる。窒素源としては同化可能な窒素化合物ま

たはこれを含有するものであればよく、例えばアンモニウム塩、硝酸塩、大豆粉、肉エキス、コーンステーパーリカー、ファーマメディアなどが用いられる。また、無機塩類としてはリン酸水素アンモニウム、リン酸水素カリウム等のリン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩などの塩類を適宜添加することもできる。

培養条件は培地組成により多少異なるが、生産の目的である本リパーゼの生産に適した条件であれば良いが、通常は以下に示す条件を選択する。すなわち、培養温度は10～40℃、より好ましくは20～37℃の範囲であり、培養時間は8時間から100時間程度であり、本リパーゼの生産が最高に達したときに培養を終了すればよい。培地のpHは5～12で行えば良いが、特に7～10が本リパーゼ生産に好適である。この様な培養により、目的とするリパーゼは主として菌体外（培養液中）に産生される。

[分離精製法]

この様にして得られた培養液からの本リパーゼの採取は、リパーゼを採取するための常法にしたがって分離、精製することにより行なうことが出来る。

すなわち、培養液からろ過法や遠心分離法などの公知の適当な方法により菌体や培地固形物を分離して得られる上清液またはろ液を分離し、これらの分離液を濃縮しまたは濃縮することなく、可溶性塩類を添加して酵素を沈殿させる塩析法、親水性有機溶剤を添加し酵素あるい

は夾雑物を沈澱させる有機溶剤沈澱法、イオン交換樹脂等を用いた吸着脱離法、ゲルろ過法、安定補助剤を加えてまたは安定補助剤なしに噴霧乾燥する方法、凍結乾燥法等の分離もしくは精製手段を単独または複数組み合わせ

5 せて用いることにより、本リパーゼを得ることができる。

[酵素力価の測定方法]

リパーゼ活性の測定は、本発明においては、トリオレイン-ポリビニルアルコール (PVA) エマルジョンを基質とする測定法を用いて実施した。

- 10 この力価の測定は具体的には以下の方法で行なった。
- 酵素液 0.1m l、1 mM 塩化カルシウムを含み、100 mM ϵ -アミノカプロン酸、100 mM ビストリス (ビス [2-ヒドロキシエチル] イミノトリス [ヒドロキシメチル] メタン) 及び100 mM TAPS
- 15 (N-トリス [ヒドロキシメチル] メチル-3-アミノプロパンスルホン酸) からなる混合液を水酸化ナトリウムでpH調整した緩衝液 (pH10.0) 0.4m l、及びトリオレインエマルジョン 0.5m l からなる混合液を共栓
- 20 付き試験管中で37℃にて10分間加熱して反応させ、
- 反応停止液として1N塩酸 0.2m lを用いて反応を停止させた。ここで、トリオレインエマルジョンとしては、
- ポリビニルアルコール (PVA) 2%水溶液 (ポパール PVA 117 (商標) 商品名) : ポパール PVA 205 (商標) 商品名) = 9 : 1 (W/W)) 10m lに
- 25 2.5gのトリオレインを加え、ホモジナイズしたものを

用いた。反応停止後、*n*-ヘキサン2ml、イソプロピルアルコール2ml、蒸留水1mlを加え激しく攪拌し、静置後ヘキサン層をサンプリングし、TLC-FID法 (Minagawaら, *Lipids*, 18, 732(1983))にてオレイン酸を定量した。活性の単位は1分間に1マイクロモルのオレイン酸を生成する酵素量を1ユニットと(1U)とした。

また、後述の実施例で洗剤に配合したプロテアーゼ活性の測定は、特公昭60-55118号に記載の力価測定法により行ない、活性の単位は、ナノカタール (nkatal = 10^{-9} katal, nkatalと略記する。) で表示した。

[酵素の性質]

本発明のリパーゼは下記の性質を有する。すなわち本発明のシュードモナス sp. (*Pseudomonas* sp.) SD 705株の生産するリパーゼについて、以下にその性質を記載する。

(1) 作用

トリグリセリドに作用し、そのエステルを加水分解する。

(2) 基質特異性

各種グリセリド、エステルなどを広範囲にわたり加水分解する。

グリセリド基質としては、各グリセリド-アラビアゴムエマルジョンを用いた。用いたエマルジョンはグリセリド10gにアラビアゴム10g、蒸留水100gを加

え、ホモジナイズしたエマルジョンを用いた。

前記エマルジョン5ml、100mM塩化ナトリウム及び25mM塩化カルシウムを含む10mMトリス緩衝液(pH10.0)5ml、蒸留水4.5ml、酵素液0.5mlの混合物を30℃、pH10にて反応せしめたときの脂肪酸生成速度を0.05N水酸化ナトリウム水溶液を用いたpHスタット滴定法により求めた。この脂肪酸生成速度を各基質の分解力とした。

トリオレインの分解力を100とするとトリブチリン125、オリーブ油55、大豆油70、綿実油66の相対活性を示す。

また、エステルに対する分解力は、p-ニトロフェニル脂肪酸エステルを基質とし、pH8.0、30℃での加水分解反応により生じるp-ニトロフェノールの比色(OD405)より求めた。

pNPP(p-ニトロフェニルパルミテート)の分解力を100とした場合、pNPL(p-ニトロフェニルラウレート)134、pNPV(p-ニトロフェニルバレレート)34の相対活性を示す。

20 (3) 作用pH及び至適pH

トリオレインエマルジョンを基質として、前記の力価測定法により測定した。反応時のpHは、3.5~12.0の範囲で異なるpHにおいて測定した。ただし緩衝液として1.0mMの塩化カルシウムを含み、100mMε-アミノカプロン酸、100mMピストリス(ビス〔2

ーヒドロキシエチル] イミノトリス [ヒドロキシメチル] メタン) 及び 100 mM TAPS (N-トリス [ヒドロキシメチル] メチル-3-アミノプロパンスルホン酸) からなる混合緩衝液を塩酸または水酸化ナトリウムで pH 調整したものを用いた。反応 pH と相対活性の関係は 5 図 1 に示すとおりであり、pH 3.5~12 の範囲で測定した場合、作用 pH は 3.5~12 であり、至適 pH は 10~11 である。

(4) 作用温度及び至適温度

10 トリオレインエマルジョンを基質として、30~80 °C の範囲の異なる反応温度にて行なうこと以外は、前記の力価測定法と同様の方法で測定した。反応温度と相対活性の関係は図 2 に示すとおりであり、30~80 °C の範囲で測定した場合の作用温度は 30~80 °C、至適温度は 55~65 °C である。40 °C 及び 70 °C においては、15 至適温度における活性の約 50% の相対活性を示す。

(5) 温度安定性

20 20 °C ~ 70 °C の温度範囲の異なる温度で pH 7 にて 1 時間保温処理した後の残存活性を、前記の力価測定法で測定した。この時の処理温度と残存活性の関係は図 3 に示すとおりであり、60 °C の処理で 80% 以上の活性を有する。処理時の緩衝液は、50 mM ε-アミノカプロン酸、50 mM ビストリス (ビス [2-ヒドロキシエチル] イミノトリス [ヒドロキシメチル] メタン) 及び 50 mM TAPS (N-トリス [ヒドロキシメチ

25

ル) メチル-3-アミノプロパンスルホン酸) からなる混合緩衝液を塩酸でpH7に調整したものをを用いた。

(6) pH安定性

pH4~12のpH範囲の異なるpHで37℃にて1
5 時間処理した後の残存活性を前記の力価測定法で測定した。この時の処理pHと残存活性の関係は図4に示すとおりであり、pH4~10で50%以上の残存活性を有する。処理時の緩衝液は0.5 mMの塩化カルシウムを含み、50 mM ϵ -アミノカプロン酸、50 mM ビス
10 トリス(ビス[2-ヒドロキシエチル]イミノトリス[ヒドロキシメチル]メタン)、50 mM TAPS (N-トリス[ヒドロキシメチル]メチル-3-アミノプロパンスルホン酸) 混合緩衝液を塩酸または水酸化ナトリウムでpH調整したものをを用いた。

15 (7) 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(分子量標準: チトクロームC(モノマー、ダイマー、トリマー、テトラマー、ヘキサマー))により得られた分子量は3
1000 \pm 2000である。

20 (8) 等電点

等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定した等電点は5.2 \pm 0.5である。

(9) 洗剤成分による影響

トリオレインエマルジョンを基質として、後記標準使
25 用濃度の各種市販洗剤(4種)と代表的な洗剤用アルカ

リプロテアーゼであるAPI-21（特公昭60-55118号）を0.3nkatal/mlの濃度で添加し反応pHを10、反応時間を30分としたこと以外は、前記の力価測定法と同様の方法により測定した。市販洗剤及びAPI-21を添加しない時の活性を100としたときの相対活性は表2に示すとおりであり、プロテアーゼを含む各種洗剤溶液中で高い活性を有する。

上記の性質を有するリパーゼは、低温（60℃以下）でも十分に機能し、洗剤溶液中でも安定にその活性を発現することから洗剤配合用リパーゼとして好ましい。

[洗剤組成物]

本発明によれば、前記の性質を有するリパーゼを配合した洗剤組成物が提供される。本発明の洗剤組成物に配合されるリパーゼの量には特に限定はないが、一般には洗剤組成物1g当たり100～10000ユニット、好ましくは500～4000ユニットの割合で配合する。この配合量が少なすぎると十分な洗浄効果の向上が得られず、また逆に多過ぎた場合には酵素配合量に比して洗浄効果の向上が大きくなり、経済性の点で好ましくない。

本発明に従えば、前記リパーゼは従来公知の任意の洗剤組成物に洗剤組成物の組成を何等変更することなく配合することができ、本発明の洗剤組成物の成分については特に限定はない。そのような洗剤組成物の代表例をあげれば、洗剤組成物重量当たり10～50重量%の界面活性剤、0～50重量%のビルダー、1～50重量%の

アルカリ剤あるいは無機電解質、0.1~5重量%の再汚染防止剤、酵素、漂白剤、蛍光染料、ケーキング防止剤及び酸化防止剤からなる群より選ばれる少なくとも1種以上の配合成分からなる洗剤組成物があげられる。

- 5 界面活性剤としては石鹼、例えば直鎖または分岐アルキルあるいはアルケニル硫酸塩、アミド硫酸塩、直鎖または分岐鎖のアルキル基またはアルケニル基を有し、エチレンオキサイド、プロピレンオキサイド及びブチレンオキサイドのうちの単独あるいは複数成分が付加したアルキルまたはアルケニルエーテル硫酸塩のような脂肪族
- 10 硫酸化物、アルキルスルホン酸塩、アミドスルホン酸塩、ジアルキルスルホコハク酸塩、 α -オレフィン、ビニリデン型オレフィン及び内部オレフィンの各スルホン酸塩のような脂肪族スルホン酸塩、直鎖または分岐鎖のアルキル
- 15 キルベンゼンスルホン酸塩のような芳香族スルホン酸塩、直鎖または分岐鎖のアルキル基またはアルケニル基を有し、エチレンオキサイド、プロピレンオキサイド及びブチレンオキサイドのうちの単独あるいは複数成分が付加したアルキルまたはアルケニルエーテルカルボン酸塩ま
- 20 たはアミド、 α -スルホ脂肪酸塩またはエステル、アミノ酸型界面活性剤、アルキルまたはアルケニル酸性リン酸エステル、アルキルまたはアルケニルリン酸塩の如きリン酸エステル系界面活性剤、スルホン酸型両性界面活性剤、ベタイン型両性界面活性剤、直鎖または分岐鎖の
- 25 アルキル基またはアルケニル基を有し、エチレンオキサ

イド、プロピレンオキサイド及びブチレンオキサイドの
うちの単独あるいは複数成分が付加したアルキルまたは
アルケニルエーテルあるいはアルコール、直鎖または分
岐鎖のアルキル基を有し、エチレンオキサイド、プロピ
5 レンオキサイド及びブチレンオキサイドのうちの単独あ
るいは複数成分が付加したポリオキシエチレンアルキル
フェニルエーテル、高級脂肪酸アルカノールアミドまた
はそのアルキレンオキサイド付加物、シヨ糖脂肪酸エス
テル、脂肪酸グリセリンモノエステル、アルキルまたは
10 アルケニルアミンオキサイド、テトラアルキルアンモニ
ウム塩型カチオン界面活性剤など洗剤組成物として通常
配合される界面活性剤であればいずれも使用可能である。
陰イオン性界面活性剤の場合の対イオンとしてはナトリ
ウムイオンまたはカリウムイオンであることが好ましい。
15 これらの界面活性剤は、単独または2種以上の混合物と
して使用される。

ビルダー及びアルカリ剤あるいは無機電解質としては
オルソリン酸塩、ピロリン酸塩、トリポリ酸塩、メタリ
ン酸塩、ヘキサメタリン酸塩、フィチン酸塩などのリン
20 酸塩、エタン-1, 1-ジホスホン酸、エタン-1, 1,
2-トリホスホン酸、エタン-1-ヒドロキシ-1, 1
-ジホスホン酸及びその誘導体、エタンヒドロキシ-1,
1, 2-トリホスホン酸、エタン-1, 2-ジカルボキ
シ-1, 2ジホスホン酸、メタンヒドロキシホスホン酸
25 などのホスホン酸塩、2-ホスホノブタン-1, 2-ジ

カルボン酸、1-ホスホノブタン-2, 3, 4-トリカルボン酸、 α -メチルホスホノコハク酸などのホスホノカルボン酸塩、アスパラギン酸、グルタミン酸などのアミノ酸塩、ニトリロ三酢酸塩、エチレンジアミン四酢酸塩、ジエチレントリアミン五酢酸塩などのアミノポリ酢酸塩、ポリアクリル酸、ポリイタコン酸、ポリマレイン酸、無水マレイン酸共重合体、カルボキシメチルセルロース塩などの高分子電解質、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコールなどの非解離高分子、ジグリコール酸、オキシジコハク酸、カルボキシメチルオキシコハク酸、クエン酸、乳酸、酒石酸、ショ糖、ラクトースなどのカルボキシメチル化物、ペンタエリスリトールのカルボキシメチル化物、グルコン酸のカルボキシメチル化物、ベンゼンポリカルボン酸、シュウ酸、リンゴ酸、オキシジコハク酸、グルコン酸などの有機酸塩、ゼオライトなどのアルミノケイ酸塩、炭酸塩、セスキ炭酸塩、硫酸塩、メタケイ酸塩などの無機塩をアルカリ金属塩として用いることができ、またデンプン、尿素などの有機物質及び塩化ナトリウム、ベントナイトなどの無機化合物を用いることができ、更には有機アルカリ剤としてトリエタノールアミン、ジエタノールアミン、モノエタノールアミン、トリイソプロパノールアミンなどを用いることができる。

本発明の洗剤組成物は、前述の如く、界面活性剤、リパーゼ、アルカリ剤または無機電解質を必須の構成成分

として含むが、その他必要に応じて両性界面活性剤、例えば過炭酸ソーダ、過ホウ酸ソーダなどの漂白剤、色素、ビルダー、例えばポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースなどの再汚染防止剤、ケーキング防止剤、酸化防止剤、プロテアーゼなどのその他の酵素を必要に応じて含ませることができる。

本発明の洗剤組成物にリパーゼあるいはプロテアーゼなどのその他の酵素を配合するには如何なる方法をもって行なってもよいが、微粉末状で配合することは、洗剤取扱い時の発塵による洗剤使用者や洗剤工業における作業者の安全衛生上好ましいことではなく、溶液状態あるいはあらかじめ発塵性をおさえた形状に賦形しておくことが好ましい。この賦形は通常良く用いられるマルメ造粒、押し出し造粒、流動造粒、遠心流動造粒やその他の方法のいずれによるものであっても良いが、本発明の洗剤組成物に配合するリパーゼあるいはプロテアーゼなどのその他の酵素の形状は特にこれらの方法によって賦形されたものに限定されるものではない。

発明を実施するための最良の形態

次に本発明を実施例を挙げて説明するが、本発明は下記の実施例に限定されるものではない。なお、下記の説明中、特に記載がない限り%は重量を基準とするものである。

5 実施例1：リパーゼ生産菌（SD705株）の培養

大豆粉2%、リン酸水素二アンモニウム0.1%、オリーブオイル1%、リン酸水素二カリウム0.5%、硫酸マグネシウム・7水和物0.1%及び炭酸ナトリウム0.3%
10 濃度の液体培地2mlを18mm径の試験管にとり、121℃、20分間高圧蒸気滅菌した後、シュードモナス sp. (Pseudomonas sp.) SD705株を1白金耳接種し、35℃で24時間、130rpmで培養した。培養後、遠心分離により菌体を除去しリパーゼ液を得た。

15 この液のリパーゼ活性は5U/mlであった。

実施例2：リパーゼ生産菌（SD705株）の培養及びリパーゼの取得 大豆粉2%、リン酸水素二アンモニウム0.1%、リン酸水素二カリウム0.5%、硫酸マグネシウム・7水和物0.1%、炭酸ナトリウム0.3%及びTwe
20 een85 1.0%濃度の液体培地2リットルを5リットル培養槽にとり、121℃、20分間高圧蒸気滅菌した後、シュードモナス sp. (Pseudomonas sp.) SD705株を接種し、35℃で24時間、1000rpmで通気攪拌培養した。培養後、遠心分離により菌体を除去
25 しリパーゼ液を得た。この液のリパーゼ活性は20U/

m l であった。

このようにして得られたリパーゼ液から硫酸沈澱法にて20~40%飽和画分の沈澱を得た。これを常法により脱塩後、凍結乾燥によりリパーゼ原末を得た。

5 実施例3：リパーゼの精製

実施例2で得られたリパーゼ原末を10%飽和の硫酸アンモニウム溶液に溶解させ、Butyl-Toyopearl 650 M (商品名, 東ソー㈱)での疎水クロマトグラフィーを行ない活性画分を得た。この活性画分を0.3mMの塩化カルシウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8)にて透析後、同緩衝液で平衡化したイオン交換クロマト樹脂(DEAE-Cellulofine A-800, 商品名, 生化学工業㈱)に吸着させ、塩化ナトリウム濃度勾配にて溶出し活性画分を得た。これを脱塩後凍結乾燥により精製酵素を得た。

15 この凍結乾燥品はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法により単一であることが確認された。

実施例4：本発明リパーゼと他のリパーゼの洗剤溶液中の活性比較

実施例2で得られたリパーゼ原末を用いて洗剤溶液中の活性測定を行ない米国特許第5069810号に記載された、シュードモナス・アルカリゲネス (Pseudomonas alcali genes) SD2株(ATCC 53877)の生産するリパーゼSD2、欧州特許第218272号に記載されたシュードモナス・シュードアルカリゲネス (Pseudomonas pseudoalcali genes) CBS 467.85株、CBS 468.85株、CBS 471.85株、C

BS 473.85株の生産するリパーゼの洗剤溶液中での活性測定結果と比較した。シュードモナス・アルカリゲネス (Pseudomonas alcaligenes) S D 2株の酵素は硫酸アンモニウム 0.5%、リン酸水素二カリウム0.05%、硫酸
5 マグネシウム・7水和物 0.025%、トリプトン 2.0%、ポリオキシエチレン (20) セチルエーテル 1.0mMの培地で30℃で16時間培養し、また、前記4種のシュードモナス・シュードアルカリゲネス (Pseudomonas ps
eudoalcaligenes) 株の酵素は、それぞれの株をスキム
10 ミルク10%、pH7の培地で20℃で48時間培養し、遠心分離で得られた培養上清を用いた。

トリオレインエマルジョンを基質として、標準使用濃度の各種市販洗剤 (4種) と代表的な洗剤用アルカリプロテアーゼであるAPI-21 (特公昭60-55118号) を
15 0.3nkat/mlの濃度で添加し反応pHを10、反応時間を30分としたこと以外は、前記の力価測定法と同様の方法により測定した。

ここで使用した市販洗剤は、アタック (商品名, 花王
製; 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、アルキル硫酸エステルナトリウム及びポリオキシエチレン
20 アルキルエーテルを含有するアニオン系界面活性剤系洗剤)、ウルトラアリエール (商品名, プロクター・アンド・ギャンブル・ファーマーイースト製; 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、アルキル硫酸エステルナ
25 トリウム、アルカノイルオキシベンゼンスルホン酸ナト

- リウム及びポリオキシエチレンアルキルエーテルを含有するアニオン系界面活性剤系洗剤)、ウルトラタイド(商品名、プロクター・アンド・ギャンブル製;アニオン系界面活性剤系洗剤)、フレッシュスタート(商品名、コルゲート・パルモリブ製;ノニオン系界面活性剤系洗剤)であり、標準使用濃度として、それぞれ最終濃度がアタック833ppm、ウルトラアリエール1000ppm、ウルトラタイド1000ppm、フレッシュスタート624ppmとなるよう添加した。
- 10 市販洗剤及びAPI-21を添加しない時の活性を100としたときの相対活性を表2に示した。

15

20

25

表 2 : 洗剤溶液中の相対活性 (単位%)

5	酵素生産菌株	洗剤なし	洗 剤			フレッシュ スタート
			アタック	ウルトラ アリエール	ウルトラ タイド	
	SD705	100	78	84	57	98
	ATCC 53877	100	31	29	33	80
	CBS 467.85	100	17	18	29	102
10	CBS 468.85	100	54	50	55	62
	CBS 471.85	100	20	16	35	85
	CBS 473.85	100	50	49	40	95

この表より、本発明リパーゼは他のリパーゼに比べて
15 洗剤溶液中で高い活性を発揮することが分かる。

すなわち、比較した他のリパーゼの中には、洗剤によ
っては本発明のリパーゼと同等レベルの相対活性を示す
ものもあるが、洗剤の種類が変わると相対活性が著しく
低下している (CBS 467.85及びCBS 468.85由来酵素)。

20 これに対して本発明のリパーゼは、洗剤の種類によらず
に高い相対活性を示すという特徴を有している。

実施例5 : 洗剤組成物及び洗濯評価

市販洗剤であるアタックに、実施例2で得られた
リパーゼ原末を2400ユニット/gとなるように配合して、
25 本発明によるリパーゼを含有する洗剤組成物を調製した。

洗濯評価は次のようにして行なった。すなわち、汚染布は、脱脂した綿布（15 cm × 15 cm）に、ベンゼンに溶解したトリオレイン70 mgを浸透させ1夜室温で乾燥したものをを用い、洗浄装置は、Terg-0-Tometer

5 を用いた。塩化カルシウムを終濃度50 ppmとなるよう添加した蒸留水1リットルに前記リパーゼ配合洗剤組成物、及び市販洗剤アタックをそれぞれ標準使用濃度で溶解した。前者の場合、液中のリパーゼ濃度は2ユニット/m lである。更に、プロテアーゼA P 1 - 2 1（特

10 公昭60-55448号）を0.3 n k a t / m lになるように添加した。洗濯液1リットルあたり6枚の前記トリオレイン汚染布を入れ、30℃の洗濯温度にて、120 r p mで30分間洗浄した。洗浄後、前記のカルシウム含有蒸留水1リットルで3分間ずつ2回すすぎを行なった後室

15 温で乾燥した。未洗浄と洗浄後の汚染布のトリオレイン量は、n - ヘキサンで抽出後前記T L C - F I D法にて定量し、洗浄効率を以下の計算式により求めた。洗浄効率（%） = {（未洗浄汚染布のトリオレイン量 - 洗浄後汚染布のトリオレイン量） / 未洗浄汚染布のトリオレイン量} × 100

20

その結果を表3に示す。

表 3 : 洗濯評価

	本発明リパーゼ添加	リパーゼ無添加
洗浄効率 (%)	78.4	68.5

5

表3に示したように本発明のリパーゼを添加した洗浄では、脂質汚れに対する洗浄効果がリパーゼ無添加に比べて高い。

実施例6 : 洗剤組成物及び洗濯評価

- 10 市販洗剤であるオール（レバーブラザーズ社，商品名）に、実施例2で得られたリパーゼ原末を2400ユニット/gとなるように配合したリパーゼ配合洗剤組成物及び、オールにプロテアーゼAPI-21（特公昭60-55448号）原末を270nk at/gとなるように配合したプロテ
- 15 アーゼ配合洗剤組成物、及びオールに実施例2で得られたリパーゼ原末を2400ユニット/g及びプロテアーゼAPI-21原末を270nk at/gとなるように配合したリパーゼ/プロテアーゼ配合洗剤組成物の3種類の洗剤組成物を調製した。
- 20 洗濯評価は次のようにして行なった。すなわち、汚染布は市販の汚染布EMPA112を用い、洗浄装置は、Terg-0-Tometerを用いた。塩化カルシウムを終濃度50ppmとなるよう添加した蒸留水1リットルに前記の洗剤組成物、または、市販洗剤であるオールをそれぞれ標
- 25 準使用濃度（終濃度1100ppm）で溶解した。リパーゼ

配合洗剤組成物の場合、液中のリパーゼ濃度は 2.6 ユニ
 ット / m l であり、プロテアーゼ配合洗剤組成物の場合、
 液中のプロテアーゼ濃度は 0.3 n k a t / m l である。
 洗濯液 1 リットルあたり 6 枚の前記汚染布を入れ、30
 5 °C の洗濯温度にて、120 r p m で 30 分間洗浄した。
 洗浄後、前記のカルシウム含有蒸留水 1 リットルで 3 分
 間ずつ 2 回すすぎを行なった後室温で乾燥した。洗浄後
 の汚染布の反射率 (460 n m) を測定した。洗浄に対
 10 する酵素の添加効果は、酵素配合洗剤組成物で洗浄した
 場合の反射率と酵素無配合の洗剤で洗浄した場合の反射
 率の差で表わした。その結果を表 4 に示す。

表 4 : 洗濯評価

15	洗剤組成物	酵素添加効果
	リパーゼ配合	8.2
	プロテアーゼ配合	9.8
	リパーゼ / プロテアーゼ配合	15.6

20 本発明によるリパーゼを添加した洗浄では、プロテア
 ーゼを添加した場合も添加しない場合も、洗浄効果がリ
 パーゼ無添加に比べて高い。

発明の効果

25 本発明のリパーゼは各種の市販洗剤溶液中、また、界

面活性剤、プロテアーゼ等の洗剤成分共存下で高い安定性と活性を有するため、洗濯条件下で油脂汚れを効率的に分解除去でき、洗剤に配合して洗浄力の増強を図ることが出来る。

- 5 また、本発明のシュードモナス *s p.* (*Pseudomonas sp.*) S D 7 0 5 株及びそれと菌学的に同等な菌株、及びその変異株は、本発明のリパーゼを効率的に生産するために有用である。

- 10 さらにまた、本発明の、かかる菌株を用いる、前記性質を有するリパーゼの製造方法は該リパーゼの生産を効率的に行なうことができる利点を有する。

また、本発明によるリパーゼを洗剤に配合することにより、洗浄特性に優れた洗剤組成物が提供される。

- 15 また、本発明によるリパーゼ及びその他の酵素を洗剤に配合することにより、洗浄特性に優れた洗剤組成物が提供される。

請求の範囲

1) 下記の性質を有するリパーゼ。

(1) 作用 pH 及び至適 pH

トリオレインエマルジョンを基質とし、pH 3.5~1
5 2の範囲で測定した場合の作用 pH が 3.5~12、至適
pH が 10~11 である。

(2) 作用温度及び至適温度

トリオレインエマルジョンを基質とし、30~80℃
の範囲で測定した場合の作用温度が 30~80℃、至適
10 温度が 55~65℃ である。

(3) 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測
定した分子量が 31000 ± 2000 である。

(4) 等電点

15 等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定
した等電点が 5.2 ± 0.5 である。

2) シュードモナス (Pseudomonas) 属に属する細菌の
培養物より得られる請求の範囲第1項記載のリパーゼ。

3) シュードモナス s p. (Pseudomonas sp.) S D 7
20 05 株 (FERM BP-4772)、それと菌学的に
同等な菌株またはそれらの変異株の培養物より得られる
請求の範囲1記載のリパーゼ。

4) 請求の範囲第1項記載のリパーゼを生産するシュー
ドモナス (Pseudomonas) 属に属する細菌、それと菌学
25 的に同等な菌株またはそれらの変異株。

5) 請求の範囲第1項記載のリパーゼを生産するシュードモナス sp. (Pseudomonas sp.) SD705株 (FERM BP-4772)、それと菌学的に同等な菌株またはそれらの変異株。

5 6) 請求の範囲第4項または請求の範囲第5項記載の細菌、それと菌学的に同等な菌株またはそれらの変異株を培養し、培養液から請求の範囲第1項記載のリパーゼを回収することを特徴とするリパーゼの製造方法。

7) 請求の範囲第1項ないし第3項のいずれかの項に記載のリパーゼを含有することを特徴とする洗剤組成物。

10 8) 請求の範囲第1項ないし第3項のいずれかの項に記載のリパーゼと他の酵素を含有することを特徴とする洗剤組成物。

15

20

25

1 / 4

図面

図 1

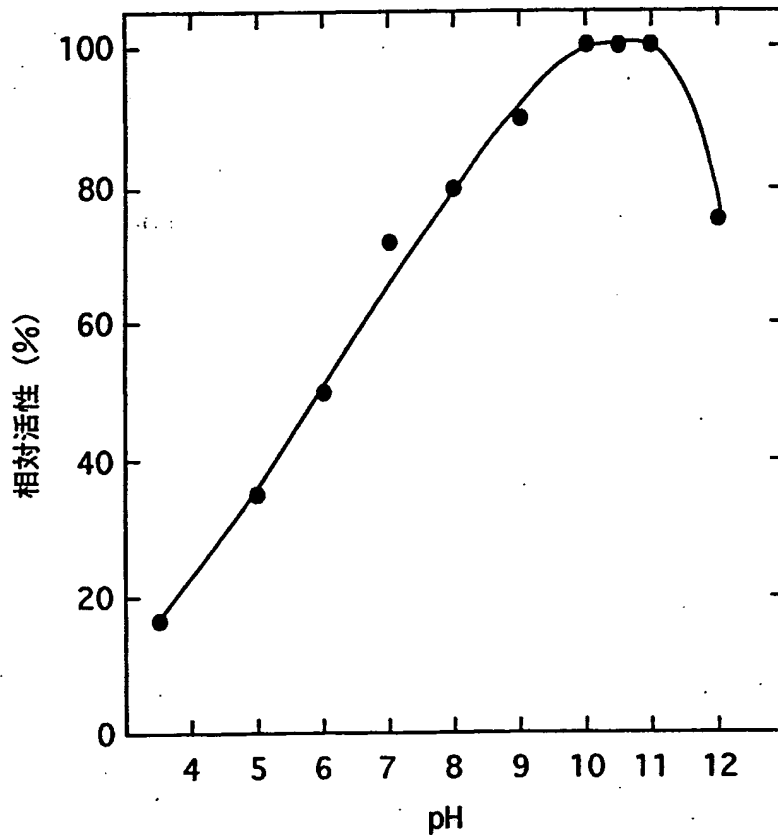


図 2

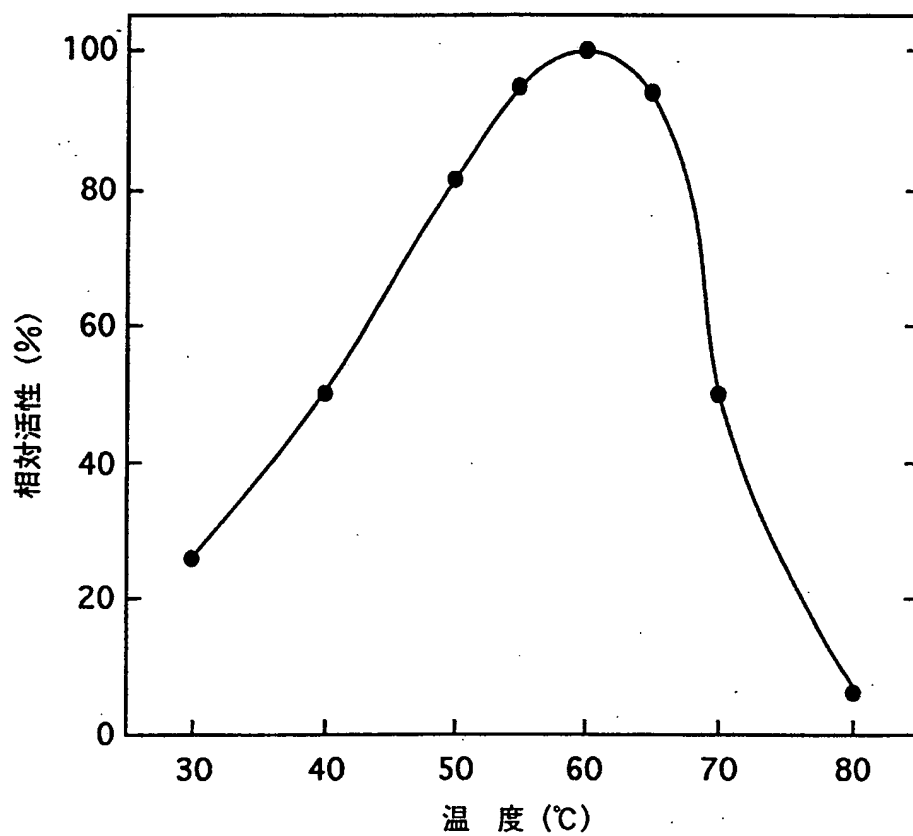


図 3

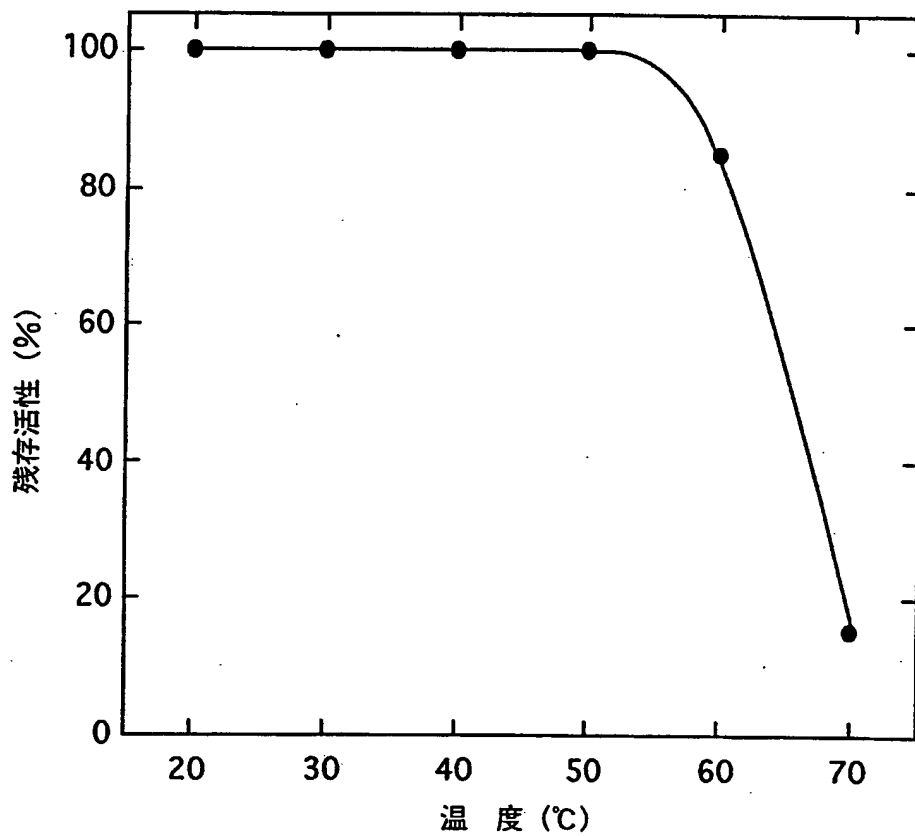
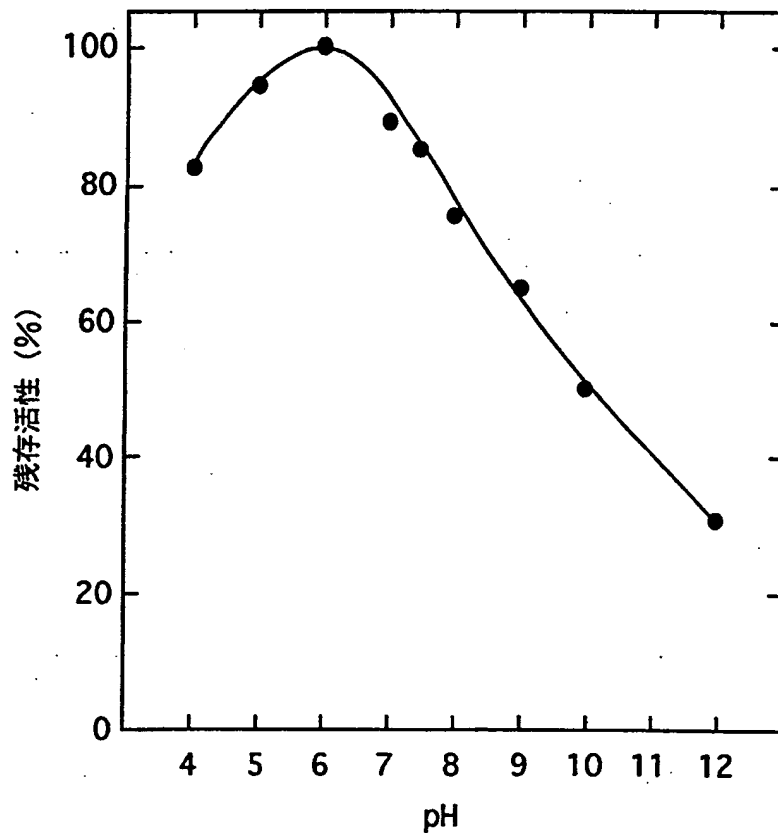


図 4



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約〕

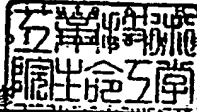
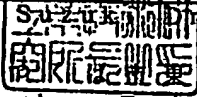
RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い発行される

Issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称) 昭和電工株式会社
 代表者 村田 一
 寄託者 あて名 ⑩ 105 殿
 東京都港区芝大門一丁目13番9号

I. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) シュールドモナス sp. SD705	(受託番号) F.E.R.M BP- 4772
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 5年 8月 4日 (原寄託日) に受領したI欄の微生物を受託する。	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、平成 5年 8月 4日 (原寄託日) にI欄の微生物を受領した。 そして、平成 6年 8月 5日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。 (平成 5年 8月 4日に寄託された微工研菌寄第 P- 13781 号より移管)	
V. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所	
名称: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology Agency for Science and Technology	
所長 鈴木 博 Osamu Suzuki, DIRECTOR GENERAL.	
あて名: 日本国茨城県 1丁目1番3号 (郵便番号 305) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305. JAPAN	
平成 6年 (1994) 8月 5日	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/01416

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. C1 ⁶ C12N9/20		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Int. C1 ⁵ C12N9/20		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CAS BIOSIS WPI, WPIL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 63-500423 (Gist-Brocades N.V.), August 8, 1986 (08. 08. 86) & EP, A, 218272 & WO, A, 8700859 & US, A, 4933287	1-8
A	JP, A, 6-38746 (Showa Denko K.K.), February 15, 1994 (15. 02. 94) & EP, A, 571982	1-8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search November 16, 1994 (16. 11. 94)		Date of mailing of the international search report December 6, 1994 (06. 12. 94)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. C12N9/20		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. C12N9/20		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAS BIOSIS WPI, WPIL		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, A, 63-500423 (ギストプロセデスナームローゼ フェンノートチャップ), 8. 8月. 1986 (08. 08. 86) &EP, A, 218272 & WO, A, 8700859 &US, A, 4933287	1-8
A	JP, A, 6-38746 (昭和電工株式会社), 15. 2月. 1994 (15. 02. 94) &EP, A, 571982	1-8
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 16. 11. 94	国際調査報告の発送日 06. 12. 94	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 種村 慈樹	4 B 9 3 5 9
電話番号 03-3581-1101 内線		3 4 4 9